白藜芦醇通过沉默调节蛋白1-解偶联蛋白2信号通路降低小鼠睾丸间质细胞TM3的氧化损伤

张晓春[1]　陈指龙[1]　方　娟[1]　黎　陈[1]　伍小松[2*]　杨　青[1*]

（1.湖南农业大学动物医学院，长沙 410128；2.湖南农业大学动物科学技术学院，长沙 410128）

摘　要：本试验旨在研究白藜芦醇（RES）对氧化损伤小鼠睾丸间质细胞TM3的保护作用，并探索其可能的作用机制。首先，用不同浓度（0、150、200、250、300 μmol/L）的过氧化氢（H_2O_2）处理小鼠睾丸间质细胞TM3 8 h，确定建立氧化损伤细胞模型的适宜H_2O_2浓度。用适宜浓度的H_2O_2建立氧化损伤细胞模型；然后，用不同浓度（0、2.5、5.0和10.0 μmol/L）的RES分别处理正常细胞和氧化损伤细胞24 h，确定RES安全浓度；最后，用安全浓度的RES处理氧化损伤细胞24 h。在整个培养过程中采用iCELLigence实时无标记细胞功能分析仪监测细胞的增殖情况；待安全浓度的RES处理氧化损伤细胞结束后采用2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）探针法检测细胞中活性氧（ROS）的含量，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）和蛋白质印迹（Western blotting）法分别检测沉默调节蛋白1(SIRT1)/UCP2信号通路中关键因子*SIRT*1和*UCP*2 mRNA和蛋白质的相对表达量。结果表明：1）用浓度为150 μmol/L及以上的H_2O_2处理细胞8 h后，极显著降低细胞存活率（$P<0.01$），因此确定150 μmol/L为建立氧化损伤细胞模型的适宜H_2O_2浓度。2)用10.0 μmol/L及以下浓度的RES处理正常细胞24 h后，细胞存活率均无显著变化（$P>0.05$）；用2.5、5.0和10.0 μmol/L的RES处理氧化损伤细胞24 h后，细胞存活率均显著提高（$P<0.05$），且各浓度RES组间无

收稿日期：2018-01-03
基金项目：国家自然科学基金项目（31772819，31572591）；中国博士后科学基金第七批特别资助（2014T70770）
作者简介：张晓春（1992—），女，辽宁丹东人，硕士研究生，从事营养对动物繁殖调控研究。E-mail: 987052094@qq.com
*通信作者：伍小松，副研究员，硕士生导师，E-mail: wuxiaosong529@126.com；杨　青，教授，博士生导师，E-mail: qingyanghn@hunau.edu.cn

显著差异（$P>0.05$）。因此，选用 5.0 μmol/L 为 RES 的安全浓度。3）用 5.0 μmol/L 的 RES 处理氧化损伤细胞 24 h 后，细胞中 ROS 的含量较极显著降低（$P<0.01$）；细胞中 *SIRT*1 mRNA 和蛋白质的相对表达量极显著增加（$P<0.01$），而 *UCP2* mRNA 和蛋白质的相对表达量则显著或极显著降低（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）。由此可见，适宜浓度的 RES 可激活 SIRT1 同时抑制 UCP2 的表达，UCP2 通过负反馈调节方式减少细胞内 ROS 的生成，从而在一定程度上抑制 TM3 细胞的氧化损伤。

关键词：白藜芦醇；氧化损伤；沉默调节蛋白 1；解偶联蛋白 2；小鼠睾丸间质细胞 TM3

中图分类号：S823;R285.5　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

当机体遭受体内外各种有害刺激时，由于机体内氧化系统与抗氧化系统平衡失调，机体内活性氧（ROS）会大量聚集，使组织细胞暴露于高浓度氧分子或氧的化学衍生物，从而引起细胞的氧化损伤。研究发现氧化损伤可引起动物严重的生精障碍，导致睾丸组织发生明显的病理变化，睾丸指数和精子数下降，精子畸形率升高，造成雄性动物不育[1-2]。白藜芦醇（RES）是一种广泛存在于葡萄、花生、虎杖、决明、藜芦等植物性食物中的天然多酚类物质，具有很广泛的生物学活性，在治疗氧化损伤、炎症、过敏、肿瘤、心血管疾病等方面都得以应用[3-4]。目前，RES 在畜禽生产中也被广泛应用，它能提高畜禽的生产性能、改善畜禽酮体品质和肉品质、提高畜禽免疫力和抗氧化能力[5]。高糖高胆固醇饮食可导致小鼠睾丸间质细胞的睾酮合成能力受损，添加 RES 能够通过减轻其氧化应激，并通过激活沉默调节蛋白 1(SIRT1)及影响下丘脑-垂体-性腺轴的调控发挥保护作用[6]。成海建等[7]研究发现 RES 可通过激活 SIRT1/腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）信号通路促进牛皮下脂肪细胞的凋亡。周曦等[8]研究发现 RES 可能通过调控 SIRTl/解偶联蛋白 2(UCP-2)信号通路抑制血管内皮细胞氧化应激损伤。SIRT1 具有去乙酰化酶活性，通过对组蛋白、多种转录因子、转录共调控因子的翻译后修饰（去乙酰化），可调节与氧化应激、凋亡、炎症反应相关基因和蛋白质的转录[9]。UCP2 作为解偶联蛋白，能影响线粒体的跨膜电位，当线粒体内膜电势升高时，UCP2

能够降低细胞膜内外氢离子（H^+）浓度，促进氧消耗，从而抑制 ROS 的产生[10]。目前，虽已明确 RES 的抗氧化作用效果，但对于其具体的作用机制尚未完全明确。因此，本研究以小鼠睾丸间质细胞 TM3 为研究对象，在过氧化氢（H_2O_2）诱导的氧化应激状态下研究 RES 对氧化损伤细胞的治疗作用，并阐明其可能的作用机制，以期为防治由氧化损伤引起的雄性生殖系统疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

小鼠睾丸间质细胞 TM3 细胞株由中国科学院上海细胞库提供；RES、H_2O_2、羊抗-UCP2 多克隆抗体和辣根过氧化物酶（HRP）标记兔抗羊免疫球蛋白 G（IgG）购自美国 Sigma 公司；兔抗-SIRT1 多克隆抗体和兔抗-β-肌动蛋白（β-actin）多克隆抗体购自英国 Abcam 公司；HRP 标记驴抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司；Trizol 购自美国 Life Technologies 公司；HiScript® Ⅱ Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒、ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司；二辛可酸（BCA）蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所；ROS 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所；放射免疫沉淀测定（RIPA）细胞裂解液和苯甲基磺酰氟（PMSF）购自北京索莱宝科技有限公司；胎牛血清购自美国 Gibco 公司；DMEM/F12 培养基购美国 Hyclone 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养

小鼠睾丸间质细胞 TM3 细胞株用 DMEM/F12 培养基（添加 10%的胎牛血清和 1%青-链霉素-两性霉素），置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养。每天更换培养基，待细胞长至对数生长期即汇合度达到 80%～90%时，使用胰酶消化制备细胞悬液。

1.2.2 iCELLigence细胞功能分析仪监测细胞增殖情况

将细胞消化离心后，用含 1%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞并计数，制备成密

度为 2.5×10^4 个/mL 的细胞悬液待用。在 E-Plate L8 板中加入含 1%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基（150 μL/孔），放入 iCELLigence 实时无标记细胞功能分析仪（Roche，德国），在仪器配备的 iPad 软件中，选择增殖试验，用含 1%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基自动调零。随后取出 E-Plate L8 板，每孔加入细胞悬液 300 μL，每组设置 3 个重复孔，待细胞静置 30 min 后将 E-Plate L8 板重新放置于 iCELLigence 实时无标记细胞功能分析仪内，点击开始进行实时监测。具体操作过程中：1）在确定建立氧化损伤细胞模型的适宜 H_2O_2 浓度的试验中，待细胞生长曲线进入对数期后（即在培养板中培养 24 h 后），将 E-Plate L8 取出，轻轻吸出 100 μL 培养基，再加入 100 μL 含不同浓度 H_2O_2 的培养基，使终浓度分别 0（正常对照组）、150、200、250 和 300 μmol/L，轻轻混匀后再将 E-Plate L8 板置于分析仪中，继续监测 8 h，此过程共监测 3 2 h。2）在确定 RES 安全浓度的试验中，待细胞生长曲线进入对数期后（即在培养板中培养 24 h 后），将 E-Plate L8 取出，分别采用 0（正常对照组）、2.5、5.0 和 10.0 μmol/L 的 RES 处理，继续监测 24 h，此过程共监测 48 h。3）在 RES 干预处理氧化损伤细胞的试验中，待细胞生长曲线进入对数期后（即在培养板中培养 24 h 后），先将细胞用 150 μmol/L 的 H_2O_2 处理 8 h，再分别用 0（H_2O_2 组）、2.5、5.0 和 10.0 μmol/L 的 RES 处理，同时设未经 H_2O_2 和 RES 处理的正常对照组，继续监测 24 h，此过程共监测 56 h。设置 iCELLigence 系统每隔 15 min 实时监测细胞增殖情况，制作增殖曲线，不同曲线可反映不同处理条件下细胞实时增殖情况，细胞增殖情况用增殖指数（proliferation index，PI）表示。在监测结束时测定各个培养板中细胞的存活率。

1.2.3　2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）探针法检测细胞中 ROS 含量

待 RES(5.0 μmol/L)处理氧化损伤细胞结束后，按照 ROS 检测试剂盒说明书测定细胞中 ROS 含量，具体操作如下：去掉培养上清液，加入含 10 μmol/L DCFH-DA 探针的新鲜培养基，37 ℃孵育细胞 40 min，用胰酶消化细胞，1 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗 1 次，离心留细胞沉淀，用 PBS 重悬细胞，调整细胞密度为 6×10^5

个/mL，使用荧光酶标仪在激发波长为 485 nm、发射波长为 525 nm 处检测荧光强度。DCFH-DA 本身没有荧光，当其进入细胞后被酯酶水解为 DCFH，而 DCFH 可被细胞内的 ROS 氧化为强绿色荧光物质 DCF，因此，其荧光强度与细胞内 ROS 的含量成正比，可用荧光强度表示 ROS 含量。

1.2.4　实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR，RT-qPCR）检测细胞中 *SIRT1* 和 *UCP2* 的 mRNA 相对表达量

待 RES(5.0 μmol/L)处理氧化损伤细胞结束后，采用 Trizol 法提取细胞的总 RNA，并用 NanoDrop 2000 测定总 RNA 的浓度和纯度。总 RNA 产物经 HiScript® Ⅱ Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒反转录后，得到 cDNA 作为模板用于 qPCR。在 ABI Step One 荧光定量 PCR 仪上，使用 ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix 试剂盒进行 RT-qPCR。反应体系：2×ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix 10 μL、上游引物 0.4 μL（10 μmol/L）、下游引物 0.4 μL（10 μmol/L）、50×ROX 0.4 μL、cDNA 2.0 μL、双蒸水（ddH_2O）6.8 μL，总体积为 20 μL。反应条件：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 10 s，60 ℃退火延伸 30 s，40 个循环。熔解曲线反应条件：95 ℃，变性 15 s，60 ℃退火 60 s，95 ℃变性 15 s。以β-肌动蛋白（β-actin）作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的 mRNA 相对表达量，对照组基因的 mRNA 相对表达量设定为 1。所用引物由华大基因股份有限公司设计合成，引物序列见表 1。

表 1　实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1　Primer sequences for RT-qPCR

基因 Gene	序列号 Accession number	引物序列 Primer sequence （5′-3′）
β-肌动蛋白 β-actin	NM_007393.5	F：CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
		R：ATGGAGCCACCGATCCACA
沉默调节蛋白 1	NM_001159589.2	F：GCTTCATGATGGCAAGTGG

*SIRT*1		R：TCGTGGAGACATTTTTAATCAGG
解偶联蛋白 2 *UCP*2	NM_011671.5	F：TCGGACACAGCCTTCT R：CTGGGAGACGAAACACTTA

F 和 R 分别代表上游和下游引物。

F and R represents forward and reverse primers, respectively.

1.2.5　蛋白质印迹（Western-blot）法检测细胞中 SIRT1 和 UCP2 的蛋白质相对表达量

待 RES 处理氧化损伤细胞结束后，弃掉培养基，用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，加入 200 μL RIPA 细胞裂解液（含 1% PMSF），吹打均匀，冰上放置 30 min，期间剧烈振荡 3 次，每次 30 s，将细胞裂解液置于 4 ℃，12 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液，采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白质浓度的测定。取适量蛋白质样品用 5×Loading Buffer 混匀，100 ℃水浴中煮 5 min 使蛋白质变性。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离蛋白质，每孔上样量为 30 μg，然后将蛋白质转印到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，使用 0.2%明胶室温摇床封闭 1 h，分别加入不同的一抗 4 ℃孵育过夜；用三羟甲基氨基甲烷吐温（TBST）洗膜 3 次，每次 10 min；加入相对应的 HRP 标记二抗室温摇床孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min；最后用 ECL 化学发光液进行显色，于 ChemiDoc^{TM} XRS^{+}成像系统中检测蛋白质条带并用 Quantity One 软件分析条带的密度值和表达量，以β-actin 为内参。

1.3　数据统计分析

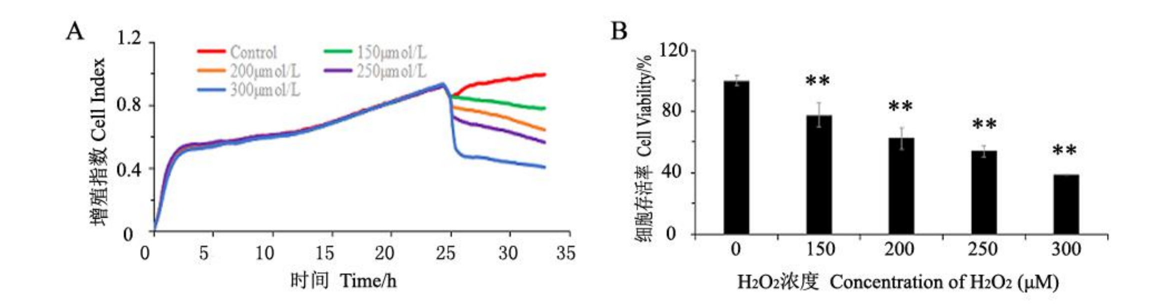
试验数据以平均值±标准差（mean±SD）表示，利用 SPSS 17.0 统计分析软件中的单因素方差分析（one-way ANOVA）进行方差分析，采用 LSD 法进行两两比较。$P<0.05$ 为差异显著，$P<0.01$ 为差异极显著。

2　结果与分析

2.1　H_2O_2 对 TM3 细胞增殖的影响

不同浓度 H_2O_2 处理 TM3 细胞 8 h 后，根据 iCELLigence 细胞功能分析仪实时监测结果(图 1)可知，与正常对照组相比，各浓度 H_2O_2 组的细胞存活率均极显著下降（$P<0.01$），且

呈浓度依赖。其中用 150 μmol/L 的 H_2O_2 处理时细胞存活率下降至 75%左右，达到预计的损伤效果。因此，在后续试验中选用 150 μmoL/L 的 H_2O_2 处理细胞 8 h 构建本试验中所需的细胞氧化损伤模型。



A：iCELLigence 细胞功能分析仪实时监测 H_2O_2 对 TM3 细胞增殖的影响。B：不同浓度 H_2O_2 处理 TM3 细胞 8 h 后对细胞增殖的影响。

A： real-time monitor the effect of H_2O_2 on proliferation of TM3 cells by iCELLigence cell function analyzer. B： effects of different concentrations of H_2O_2 on proliferation of TM3 cells after treated for 8 h.

数据柱标“**”表示与正常对照组相比差异极显著（P<0.01）。下图同。

Value columns of each with“**”mean extremely significant difference compared with the normal control group (P<0.01). The same as below.

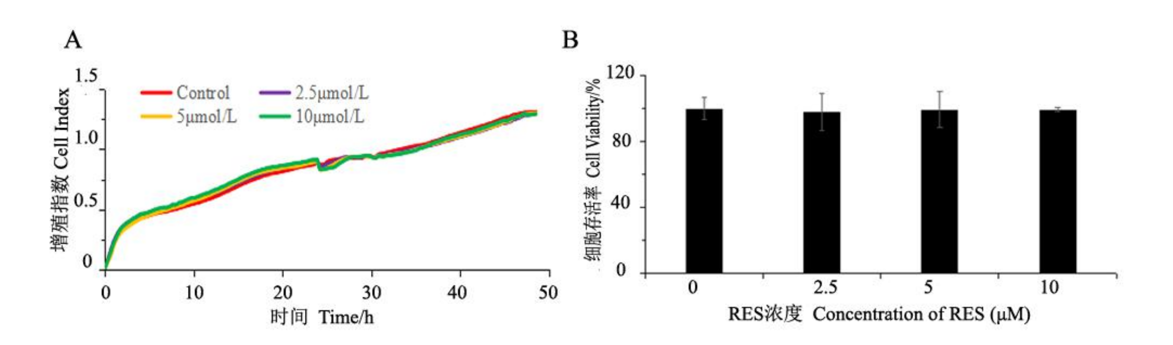
图 1 不同浓度 H_2O_2 对 TM3 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of H_2O_2 on proliferation of TM3 cells

2.2 RES 对 TM3 细胞增殖的影响

为研究 RES 对 H_2O_2 致 TM3 细胞氧化损伤的作用效果，首先检测了 RES 对 TM3 细胞增殖的影响，由图 2 可知，用浓度分别为 2.5、5.0 和 10.0 μmol/L 的 RES 处理正常细胞 24 h 后，各浓度 RES 组与正常对照组的细胞存活率无显著差异（P>0.05）。由图 3 可知，当用 RES 处理氧化损伤细胞 24 h 后，与 H_2O_2 组（仅经 H_2O_2 单独处理，未经 RES 处理的氧化损伤细胞）相比，各浓度 RES 组的细胞存活率均显著提高（P<0.05），但仍无法恢复到正常

对照组水平，且各浓度 RES 组间无显著差异（*P*>0.05），因此，后续试验中选取浓度为 5 μmol/L 的 RES 对氧化损伤 TM3 细胞进行处理。

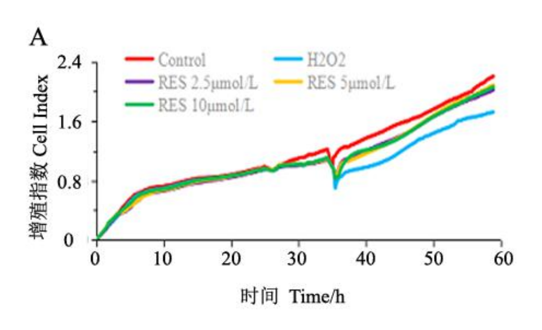


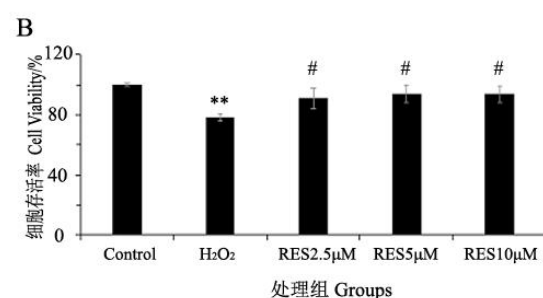
A：iCELLigence 细胞功能分析仪实时监测 RES 对 TM3 细胞增殖的影响。B：不同浓度 RES 处理 TM3 细胞 24 h 后对细胞增殖的影响。

A： real-time monitor the effects of RES on proliferation of TM3 cells by iCELLigence cell function analyzer. B： effects of different concentrations of RES on proliferation of TM3 cells after treated for 24 h.

图 2 不同浓度 RES 对 TM3 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of RES on proliferation of TM3 cells





A：iCELLigence细胞功能分析仪实时监测RES对H_2O_2诱导氧化损伤TM3细胞增殖的影响。B：RES处理24 h对H_2O_2诱导氧化损伤TM3细胞增殖的影响。

A： real-time monitor the effects of RES on proliferation of H_2O_2-induced oxidative-damaged TM3 cells by iCELLigence cell function analyzer. B： effects of RES on proliferation of H_2O_2-induced oxidative-damaged TM3 cells after treated for 24 h.

数据柱标注“#”表示与H_2O_2组相比差异显著（*P*<0.05）。

Value columns with “#” mean significant difference compared with H_2O_2 group (*P*<0.05).

图 3　RES 对 H_2O_2 诱导氧化损伤 TM3 细胞增殖的影响

Fig.3　Effects of RES on proliferation of oxidative-damaged TM3 cells induced by H_2O_2

2.3　RES 对氧化损伤 TM3 细胞中 ROS 含量的影响

由图 4 可知，正常细胞经 H_2O_2 的处理后，细胞内相对荧光强度极显著增强（*P*<0.01），即表明细胞中 ROS 含量显著升高；而氧化损伤细胞经 RES 处理后，细胞内相对荧光强度极显著下降（*P*<0.01），但仍无法恢复至正常对照组的水平。这说明 RES 能够在一定程度上抑制氧化损伤 TM3 细胞中 ROS 的产生。

相对荧光强度
Relative fluorescence intensity
3
2
1
0
**
##
Control
H2O2
H2O2+RES
处理组（Groups）

数据柱标注“##”表示与H_2O_2组相比差异极显著（*P*<0.01）。下图同。

Value columns with “##” mean extremely significant difference compared with H_2O_2 group (*P*<0.01). The same as below.

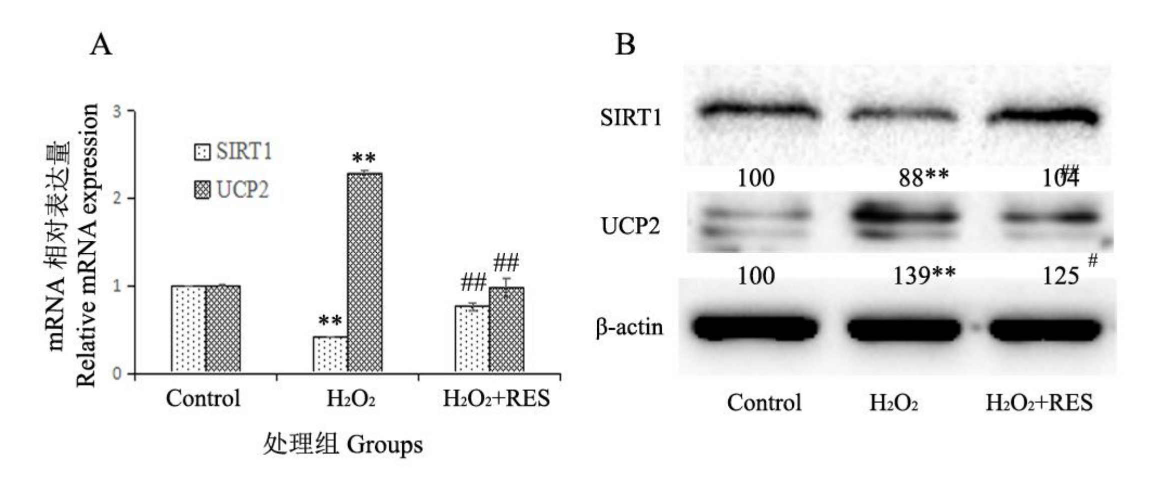
图 4　RES 对 H_2O_2 诱导氧化损伤 TM3 细胞中 ROS 含量的影响

Fig.4　Effects of RES on ROS content in oxidative-damaged TM3 cells induced by H_2O_2

2.4　RES 对氧化损伤 TM3 细胞中 *SIRT*1 和 *UCP*2 mRNA 和蛋白质相对表达量的影响

由图 5-A 可知，正常细胞经 H_2O_2 的处理后，细胞中 *SIRT*1 mRNA 相对表达量极显著降低（*P*<0.01），*UCP*2 mRNA 相对表达量极显著增加（*P*<0.01）。而氧化损伤细胞经 RES 处理后，细胞中 *SIRT*1 mRNA 相对表达量极显著增加（*P*<0.01），*UCP2* mRNA 相对表达量极显著降低（*P*<0.01）。由图 5-B 可知，细胞中 SIRT1 和 UCP2 蛋白质相对表达量的变化趋

势与其 mRNA 相对表达量变化趋势一致，即 H_2O_2 处理导致 SIRT1 蛋白质相对表达量极显著降低（P<0.01），而使 UCP2 蛋白质相对表达量表达极显著增加（P<0.01）；RES 处理可极显著提高氧化损伤细胞中 SIRT1 蛋白质相对表达量（P<0.01），显著降低 UCP2 蛋白质相对表达量（P<0.05）。



A：qPCR 检测 RES 对 H_2O_2 诱导氧化损伤 TM3 细胞中 *SIRT*1 和 *UCP*2 mRNA 相对表达量的影响。B：Western-blot 法检测 RES 对 H_2O_2 诱导氧化损伤 TM3 细胞中 SIRT1 和 UCP2 蛋白质相对表达量的影响。

A：detection of the mRNA relative expression levels of *SIRT*1 and *UCP*2 in H_2O_2-induced oxidative-damaged TM3 cells with treatment of RES by qPCR. B： detection of the protein relative expression levels of SIRT1 and UCP2 in H_2O_2-induced oxidative-damaged TM3 cells with treatment of RES by Western-blot method.

同行数据肩标“**”表示与正常对照组相比差异极显著（P<0.01），肩标“##”表示与 H_2O_2 组相比差异极显著（P<0.01），肩标“#”表示与 H_2O_2 组相比差异显著（P<0.05）。

Values in the same line of with “**” superscript means extremely significant difference compared with the normal control group (P<0.01)， with “##” superscript means extremely significant difference compared with the H_2O_2 group (P<0.01)， and with “#” superscript means

significant difference compared with the H_2O_2 group ($P<0.05$).

图5　RES对H_2O_2氧化损伤TM3细胞中*SIRT*1和*UCP*2 mRNA及蛋白质相对表达量的影响

Fig.5　Effects of RES on mRNA and protein relative expression levels of *SIRT*1 and *UCP*2 in oxidative-damaged TM3 cells induced by H_2O_2

3 讨　论

3.1　H_2O_2诱导 TM3 细胞氧化损伤模型的建立

目前，在细胞氧化损伤模型的建立中，多以 H_2O_2 作为诱导剂，不同类型的细胞对诱导剂的敏感性不一样，因此诱导剂的浓度和处理时间非常关键[11-12]。当诱导剂浓度过高或处理时间过长时会导致细胞损伤太严重，不利于抗氧化机制的研究；而当损伤程度太弱时，细胞可能通过自身修复影响相关的研究。对于细胞氧化损伤模型，一般通过噻唑蓝（MTT）法检测，根据其吸光度值来判断细胞增殖情况从而确定氧化损伤程度，MTT 法虽然有其优势，如重复性较好、特异性强等，但每次只能确定 1 个时间点细胞的增殖情况。本试验中采用 iCELLigence 细胞功能分析仪实时监测，可更直观地判断细胞的增殖情况，而且监测过程中不需要特殊试剂，可减少因多次操作所导致的误差。本试验中，通过 iCELLigence 细胞功能分析仪实时监测，发现 150 µmol/L 的 H_2O_2 处理细胞 8 h，细胞存活率下降至 75%左右，符合后续抗氧化损伤实验的要求，因此确定采用 150 µmol/L 的 H_2O_2 建立细胞氧化损伤模型。

3.2　RES 对氧化损伤细胞的保护作用

研究表明，动物体中 90%的 ROS 源于线粒体电子呼吸传递链，ROS 的产生与线粒体能量代谢紧密相关，当 ROS 含量增加时，会对线粒体的结构、功能造成损伤，而线粒体受到损伤后又会促进 ROS 的生成，如此恶性循环，加重氧化损伤程度[13-14]。解偶联蛋白（UCPs）是位于线粒体内膜上的一类转运蛋白，它们可以介导线粒体内膜的“质子漏”使能量以热的形式散失[15]。UCP2 作为 UCPs 家族成员之一，是 UCPs 在生殖系统中的主要存在形式[16-17]。大量试验表明，UCP2 可以调控 ROS 的生成，并参与多种组织的抗氧化损伤作用。Brand[18] 提出了 UCP2 对 ROS 的负调控假设模型，当 ROS 含量增加时，过氧化物在化学转化过程中产生的某种物质激活 UCP2 的质子漏活性，导致线粒体膜电位的下降，UCP2 就以一种负反馈调节的方式来限制 ROS 的生成，表明在氧化应激过程中，UCP2 可以通过降低 ROS 的生

成量保护机体免受过氧化损伤。同样的结论在 Zhang 等[19]、王晓娜等[20]的试验中也得到证实。Zhang 等[19]的试验表明，高温诱导的凋亡能引起小鼠睾丸内 ROS 含量增加，UCP2 蛋白质表达量也随之增加；王晓娜等[20]试验发现，精子内 UCP2 蛋白质的表达量与过氧化氢的作用浓度呈正相关，UCP2 为了对抗增加的 ROS，表达量也随之增加。SIRT1 作为一种核蛋白，能够以转录的形式抑制 UCP2 的转录活性，通过与 UCP2 启动子结合，抑制 *UCP2* 基因的表达，减少其编码的线粒体内膜蛋白的生成，从而抑制线粒体中解偶联反应的发生[21]。相关研究表明，经不同药物诱导的大鼠或小鼠氧化应激模型中，SIRT1 都表现出低表达状态，而 SIRT1 一经激活，可导致 UCP2 的表达下降[8,22-23]。结合以上信息推测，在本试验中，RES 通过对 SIRT1/UCP2 信号通路的调节发挥对氧化损伤小鼠睾丸间质细胞 TM3 的保护作用。

本试验结果显示，与正常对照组相比，H_2O_2组细胞中ROS含量极显著增加，*SIRT1* mRNA及蛋白质的相对表达量均极显著降低，而*UCP2* mRNA及蛋白质的相对表达量极显著升高，提示细胞被H_2O_2损伤后细胞中SIRT1含量的降低可能诱导UCP2含量的增加，以抵抗细胞中增加的ROS。UCP2生成量增加，解偶联线粒体内氧化磷酸化过程，减少ATP的生成，ROS的生成量应该下降，但氧化应激在细胞中UCP2表达增强的情况下仍持续存在，推测可能是由于UCP2增加的量不足以抵抗ROS的过量产生。相比氧化损伤细胞，采用RES处理后由H_2O_2所致的*SIRT1* mRNA及蛋白质表达的下调和*UCP2* mRNA及蛋白质表达的上调均在一定程度上受到抑制，且细胞中ROS含量也极显著下降，提示RES作为SIRT1的激活剂，能够促进其表达。SIRT1被激活后，可抑制UCP2的表达，理论上应该会产生更多的ROS，但实际采用RES处理后氧化损伤细胞中ROS的含量相对未经RES处理的氧化损伤细胞而言是减少的，分析原因可能是UCP2对ROS存在负反馈调节，即UCP2表达被抑制后，细胞中ROS的含量增加，UCP2通过负反馈调节的方式限制ROS的产生。

此外，在本研究中发现，在正常 TM3 细胞中 *UCP2* mRNA 的表达较丰富，而其蛋白质较难检测到，而经 H_2O_2 损伤后 TM3 细胞中 UCP2 蛋白质的相对表达量极显著增加。这种情况的出现可能与抗体的特异性有关；也可能是在生理状态下，某些器官中的 *UCP2* mRNA 并不最终表达为蛋白质，而在病理状态下就可以启动 *UCP2* mRNA 翻译为蛋白质。在 Fisler 等[24]的研究中也在胰腺、脾脏、心脏、下丘脑、肺、睾丸、巨噬细胞等检测到大量的 *UCP2*

mRNA，而用 Western blot 法仅在下丘脑、巨噬细胞、白色脂肪组织、脾脏、胰岛的实质细胞中检测到了 UCP2 蛋白质。

4 结　论

SIRT1/UCP2 信号通路介导了 H_2O_2 致 TM3 细胞的氧化损伤，RES 通过活化 SIRT1 抑制 UCP2 表达，UCP2 通过负反馈调节方式削弱氧化损伤细胞内 ROS 的生成，从而在一定程度上抑制 TM3 细胞的氧化损伤。

参考文献：

[1] ASADI N,BAHMANI M,KHERADMAND A,et al.The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it:a review[J].Journal of Clinical and Diagnostic Research,2017,11(5):IE01–IE05.

[2] 陈指龙,张晓春,薛立群,等.环磷酰胺致小鼠生精障碍作用研究[J].动物医学进展,2017,38(5):34–38.

[3] PANGENI R,SAHNI J K,ALI J,et al.Resveratrol:review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery[J].Expert Opinion on Drug Delivery,2014,11(8):1285–1298.

[4] MALHOTRA A,BATH S,ELBARBRY F.An organ system approach to explore the antioxidative,anti-inflammatory,and cytoprotective actions of resveratrol[J].Oxidative Medicine and Cellular Longevity,2015,2015:803971.

[5] 张成,耿照玉,赵晓惠.白藜芦醇的生物学功能及其在畜禽生产中的应用[J].动物营养学报,2017,29(11):3837–3843.

[6] 王慧君.白藜芦醇对高糖高胆固醇饮食小鼠睾丸 Leydig 细胞睾酮合成障碍的保护作用研究[D].硕士学位论文.合肥:安徽医科大学,2014.

[7] 成海建,游伟,靳青,等.白藜芦醇通过激活去乙酰化酶 1/腺苷一磷酸激活的蛋白激酶信号通路影响牛脂肪细胞凋亡[J].动物营养学报,2017,29(12):4398–4407.

[8] 周曦,易龙,金鑫,等.SIRT1/UCP2 通路在白藜芦醇抑制血管内皮细胞氧化应激损伤中的作

用[J].第三军医大学学报,2013,35(16):1671–1675.

[9] HSU C P,ZHAI P Y,YAMAMOTO T,et al.Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion[J].Circulation,2010,122(21):2170–2182.

[10] MATTIASON G,SULLIVAN P G.The emerging functions of UCP2 in health,disease,and therapeutics[J].Antioxidants & Redox Signaling,2006,8(1/2):1–38.

[11] 张润蔚,王玲,张春晓,等.过氧化氢诱导斜带石斑鱼原代肝细胞氧化损伤模型的构建[J].动物营养学报,2017,29(4):1227–1232.

[12] 丁逍，刘琳，陈迪,等.过氧化氢诱导原代大鼠睾丸间质细胞氧化损伤模型的建立[J].南京农业大学学报,2014,37(4):99–104.

[13] 乔卫龙,李炜弘,史年刚,等.线粒体能量代谢与疾病关联机制的研究进展[J].云南中医中药杂志,2016,37(4):61–62.

[14] 韩孝先,刘泽宇,周庆彪,等.线粒体在炎症调控中的作用研究进展[J].癌变·畸变·突变,2017,29(6):467–470,475.

[15] 李海.线粒体解耦联蛋白 2 与能量代谢[J].内江师范学院学报,2010,25(8):52–55.

[16] 郑贵浪.UCP2 在脓毒症大鼠心肌细胞线粒体中的作用及初步机制探讨[D].博士学位论文.广州:南方医科大学,2016.

[17] JI F,SHEN T J,ZOU W Z,et al.UCP2 Regulates embryonic neurogenesis via ROS-mediated yap alternation in the developing neocortex[J].Stem Cells,2017,35(6):1479–1492.

[18] BRAND M D.Uncoupling to survive?The role of mitochondrial inefficiency in ageing[J].Experimental Gerontology,2000,35(6/7):811–820.

[19] ZHANG K J,SHANG Y L,LIAO S Y,et al.Uncoupling protein 2 protects testicular germ cells from hyperthermia-induced apoptosis[J].Biochemical and Biophysical Research

Communications,2007,360(2):327–332.

[20] 王晓娜,朱春芳,张家燕,等.精子的氧化损伤与线粒体解偶联蛋白 2(*UCP*2)表达的关联性[J].医学研究杂志,2017,46(7):62–66.

[21] BORDONE L,MOTTA M C,PICARD F,et al.Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells[J].PLoS Biology,2006,4(9):e295.

[22] 徐静,李楠,王俊红,等.二甲双胍对 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠肝脏 *SIRT*1、*UCP*2 表达的影响[J].中南大学学报（医学版）,2013,38(9):882–887.

[23] 张玉佩,孔怡琳,杨钦河,等.SIRT1/UCP2 通路在脂肪变性 HepG2 细胞线粒体能量代谢中的调控机制[J].中国老年学杂志,2016,36(3):513–516.

[24] FISLER J S,WARDEN C H.Uncoupling proteins,dietary fat and the metabolic syndrome[J].Nutrition & Metabolism,2006,3:38.

Resveratrol Attenuates Acute Oxidative Injury in Mouse Leydig Cell TM3 via Silent Information Regulator 1/Uncoupling Protein 2 Signaling Pathway

ZHANG Xiaochun[1] CHEN Zhilong[1] FANG Juan[1] LI Chen[1] WU Xiaosong[2*] YANG Qing[1*]

（1. *College of Veterinary Medicine*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*; 2. *College of Animal Science and Technology*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*）

Abstract: This experiment was conducted to investigate the protective effect of resveratrol (RES) on oxidative-damaged mouse Leydig cell TM3, and to explore its possible mechanism. Firstly, TM3 cells were treated with different concentrations (0, 150, 200, 250 and 300 μmol/L) of hydrogen peroxide (H_2O_2), and the optimal concentration of H_2O_2 was selected to establish the

---

*Corresponding authors: WU Xiaosong, associate professor, E-mail: wuxiaosong529@126.com; YANG Qing, professor, E-mail: qingyanghn@hunau.edu.cn （责任编辑 菅景颖）

oxidative-damaged cell model. Secondly, the normal cells and oxidative-damaged cells were treated with different concentrations (0, 2.5, 5.0 and 10.0 μmol/L) of RES for 24 h to select the safe concentration of RES. Finally, the oxidative-damaged cells were treated with safe concentration of RES for 24 h. Cell proliferation was real-time monitored by iCELLigence cell function analyzer during the whole culture process. After the oxidative-damaged cells treated by safe concentration of RES, the reactive oxygen species (ROS) content in cell was detected by 2′,7′-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe method, and the real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting method were used to detect the mRNA and protein relative expression levels of silent information regulator 1 (*SIRT*1) and uncoupling protein 2 (*UCP*2) which were the key factors in SIRT1/UCP2 signal pathway, respectively. The results showed as follows: 1) the cell viability was extremely significantly reduced after treatment with a concentration of 150 μmol/L or more of H_2O_2 for 8 h (P<0.01). So, the concentration of 150 μmol/L was selected as the optimal concentration of H_2O_2 to establish the oxidative-damaged cell model. 2) The cell viability had no significant change when the normal cells treated by 10.0 μmol/L or less RES for 24 h (P>0.05); the cell viability was significantly increased when the oxidative-damaged cells treated by 2.5, 5.0 and 10.0 μmol/L RES for 24 h (P<0.05), and no significant difference among different concentration RES groups (P>0.05). So, the concentration of 5.0 μmol/L was selected as the safe concentration. 3) When the oxidative-damaged cells were treated by 5 μmol/L of RES for 24 h, the content of ROS in cells was extremely significantly increased (P<0.01); the relative expression levels of *SIRT*1 mRNA and protein were extremely significantly up-regulated (P<0.01), while the relative expression levels of *UCP*2 mRNA and protein were extremely significantly or significantly down-regulated (P<0.01 or P<0.05). It is concluded that RES can activate the expression of SIRT1 and inhibit the expression of UCP2; meanwhile, UCP2 can attenuate the production of ROS in cells through a negative feedback regulation, thereby inhibiting the oxidative injury of TM3 cells to some extent.

Key words: resveratrol; oxidative injury; SIRT1; UCP2; mouse Leydig cell TM3